



RECEIVED #3

NOV 19 2001 11-27-01

TECH CENTER 1600/2900

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

ATTY.'S DOCKET: IKEGAMI=2

In re Application of:) Art Unit: 1638
Hakuo IKEGAMI et al) Examiner:
Appln. No.: 09/893,005) Washington, D.C.
Filed: June 26, 2001) Confirmation No. 6398
For: TRANSGENIC PLANTS) November 16, 2001
)
)

REQUEST FOR PRIORITY

Honorable Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In accordance with the provisions of 37 CFR §1.55 and the requirements of 35 U.S.C. §119, filed herewith a certified copy of:


Japanese Appln. No.: 200195/2000 Filed: June 30, 2000.

It is respectfully requested that applicant be granted the benefit of the priority date of the foreign application.

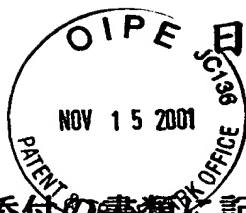
Respectfully submitted,

BROWDY AND NEIMARK, P.L.L.C.
Attorneys for Applicant(s)

By


Norman J. Latker
Registration No. 19,963

NJL:jmb
Telephone No.: (202) 628-5197
Facsimile No.: (202) 737-3528
f:/s/suma/ikegami2/PriorityDocPTOCoverLtr16nov01.doc



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

RECEIVED
NOV 19 2001
TECH CENTER 1600/2900

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

2000年 6月30日

出願番号
Application Number:

特願2000-200195

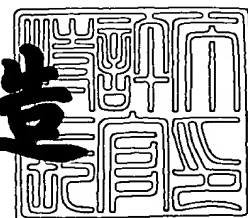
出願人
Applicant(s):

株式会社林原生物化学研究所
杉本 千尋
株式会社北海道グリーンバイオ研究所
ホクレン農業協同組合連合会

2001年 6月13日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3055384

【書類名】 特許願

【整理番号】 10085001

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 C12N 15/05
C12N 15/82
C12N 15/19

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県総社市溝口 2 1 7 番地

【氏名】 池上 伯郎

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市伊福町 3 丁目 2 8 番 5 号

【氏名】 栗本 雅司

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市西区西町南 2 丁目 5 番 5 号

【氏名】 杉本 千尋

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市厚別区厚別南 4 丁目 1 番 1 7 号

【氏名】 松村 健

【特許出願人】

【識別番号】 000155908

【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所

【代表者】 林原 健

【特許出願人】

【住所又は居所】 北海道札幌市西区西町南 2 丁目 5 番 5 号

【氏名又は名称】 杉本 千尋

【特許出願人】

【識別番号】 592113500

【氏名又は名称】 株式会社北海道グリーンバイオ研究所
【代表者】 矢野 征男
【特許出願人】
【識別番号】 390022954
【氏名又は名称】 ホクレン農業協同組合連合会
【代表者】 藤田 久雄
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 035736
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1
【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トランスジェニック植物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 哺乳類起源の生理活性蛋白質をコードする DNA で食用植物を形質転換することにより創製されたトランスジェニック植物。

【請求項 2】 生理活性蛋白質がサイトカインから選ばれる 1 種又は 2 種以上である請求項 1 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 3】 生理活性蛋白質が、インターフェロン類、インターロイキン類、造血因子類、及び増殖因子類から選ばれる 1 種又は 2 種以上である請求項 1 又は 2 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 4】 生理活性蛋白質の起源が、ヒト、ウシ、ブタ、マウス又はラットである請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載のトランスジェニック植物。

【請求項 5】 食用植物がヒトが加熱処理することなく食しうる植物である請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のトランスジェニック植物。

【請求項 6】 食用植物が、ナス科、セリ科、キク科、アブラナ科、ウリ科、バラ科、ブドウ科、ツツジ科、パパイア科、マメ科、クルミ科、又はアカザ科に属する植物である請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載のトランスジェニック植物。

【請求項 7】 哺乳類起源の生理活性蛋白質を食用の組織に含む請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載のトランスジェニック植物。

【請求項 8】 葉、茎、根、果実、果皮、芽、種子及び花卉から選ばれる 1 種又は 2 種以上の、単離された形態にある請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載のトランスジェニック植物。

【請求項 9】 細断、皮剥、粉碎、圧搾又は抽出を含む加工処理が施された請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載のトランスジェニック植物。

【請求項 10】 トレハロースと接触させてなる請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載のトランスジェニック植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は新規なトランスジェニック植物、詳細には、哺乳類起源の生理活性蛋白質をコードするDNAで食用の植物を形質転換して創製されたトランスジェニック植物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年の医学の進歩にはめざましいものがあり、従来は重篤とされていた諸種の疾患のうちの多くはその対処法が確立されるに至っている。その結果、疾患によっては現在では根絶されたものさえある。しかしながら、例えば、ある種の悪性腫瘍に見られるように、重篤な疾患は今なお多く存在し、このような重篤な疾患に罹患した患者は、通常、日常生活を大幅に制限した上で、症状を観察しながら医師の処方のもとで諸種の療法が施されることとなる。

【0003】

このことから、このような重篤な疾患を、それに罹患した際に対処するのではなく、日常生活を送る上で確度よく予防する方法の確立が待ち望まれている。しかしながら、疾患の予防方法は、多くの場合、適度な運動や偏りのない食事など生活訓的なものでしかなく、確実に予防を達成しうるものとはいえない。

【0004】

重篤な疾患に対する、サイトカインをはじめとする生理活性蛋白質を用いる療法は著効を発揮する場合がある。しかしながら該蛋白質は一般に、日常生活を送る上で容易に入手し利用できるものではない。また、該蛋白質は、通常、高度に精製された上で医薬製剤として用いられ、その効果が顕著に現れる場合がある反面、副作用を伴う場合もある。したがって、生理活性蛋白質を利用する現行の療法は、上記の期待に応えられるものではない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

斯かる状況に鑑み、この発明の課題は、悪性腫瘍等の重篤な疾患を日常生活を送る上で確度よく簡便に予防し得る手段を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、生理活性蛋白質の作用に着目し、該蛋白質を経口摂取してその本来の機能を穏やかに発揮させることができれば上記の課題が解決しうるとの仮説を立て、本仮説に基づいて研究に着手した。しかしながら、上記でも述べたとおり、生理活性蛋白質は一般には入手が容易ではないという問題があった。そこで、本発明者らは、この問題を解決するために、通常の食用植物と同様にして食すことができ、哺乳類起源の生理活性蛋白質をその植物体に含む植物を遺伝子工学的手法により創製することを試みた。

【0007】

先ずはじめに、常法により入手した、哺乳類起源の生理活性蛋白質をコードするDNAで食用の植物細胞を形質転換し、植物体として再生させてトランスジェニック植物を創製した。斯くして得たトランスジェニック植物はその生体内に該生理活性蛋白質を本来の活性を発揮する形態で発現していることが確認された。そして、斯かるトランスジェニック植物の経口摂取の効果を動物実験により調べたところ、該動物の体内においても生理活性蛋白質は所期の機能を発揮し、該動物の生体機能が調整されることが確認された。さらに、通常の医薬用途に利用されるものと同レベルにまで精製された、生理活性蛋白質の単離標品による効果と比較した。その結果、全く意外なことに、当該トランスジェニック植物は、生理活性蛋白質の単離標品ないしはそれを含む組成物を経口摂取した場合と比較すると、より確実に生体機能調整能を示すことが判明した。以上のことから、本発明者らは、生理活性蛋白質が、植物の生体内にその一成分として含まれるときには、動物により経口摂取された際に極めて良好に所期の効果を発揮することを独自の知見として見出した。この発明は本発明者らによる以上の独自の知見に基づいて完成されたものである。

【0008】

すなわち、この発明は、上記の課題を、哺乳類起源の生理活性蛋白質をコードするDNAで食用の植物を形質転換して創製されたトランスジェニック植物を提供することにより解決するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】

この発明は哺乳類起源の生理活性蛋白質をコードするDNAで食用植物を形質転換することにより創製されたトランスジェニック植物を提供するものである。この発明で対象とする哺乳類起源の生理活性蛋白質は、哺乳類が本来生体内に産生する、生理機能の維持・調整に関わる蛋白質であって、トランスジェニック植物に含まれる形態でヒトを含む動物が摂取したときに所期の機能を発揮するものであればよく、特定の分子種や起源に限定されるものではない。具体的には哺乳類起源のサイトカインが挙げられ、より詳細には、インターフェロン類、インターロイキン類、造血因子類、増殖因子類などが挙げられる。これらの生理活性蛋白質のうち、インターフェロン類であるインターフェロン α や造血因子類であるエリトロポエチンは、この発明によるトランスジェニック植物に含まれた形態で経口摂取されると、より確実に、かつ、副作用を示さない範囲で良好に所期の機能を発揮するので、この発明の実施に特に有用である。

【0010】

この発明で対象とする生理活性蛋白質の起源は、上述のとおり特定のものに限定されないけれども、生理活性蛋白質はその活性発現の際に種特異性を示す場合があるので、この発明のトランスジェニック植物を摂取すると想定される動物やその近縁種起源のものが比較的望ましい。該起源の具体例としては、ヒトを含む霊長類、ウシ、ブタを含む偶蹄類、マウス、ラットを含む齧歯類などが挙げられる。

【0011】

この発明を実施するには、先ず、上記の生理活性蛋白質をコードするDNAを調製する。この発明で用いるDNAは、所望の給源より通常のDNAクローニング法により調製することができる。また、該DNAの塩基配列や給源等、そのDNAに関する情報が公知である場合、その情報に基づいてPCR等慣用の手法により調製することもできる。例えば、米国国立衛生研究所(NIH)により管理運営されている『ジェンバンク』等の慣用の核酸データベースには諸種のDNAに関する情報が収載されているので、斯かるデータベースはこの発明を実施する上で有利に利用できる。

【 0 0 1 2 】

上記のようにして入手されるDNAは、得られたそのままの形態で植物を形質転換する際のベクター（後述）に組み込んで用いることもできるが、目的に応じて、DNAにおけるコード配列及び／又はその5' 上流又は3' 下流に隣接する配列に、塩基の付加、置換、及び／又は欠失により適宜改変を加えた上で用いることもできる。いずれにしても、この発明で用いるDNAは、対象とする、活性型もしくは成熟型の生理活性蛋白質をコードするものであればよく、コード配列そのものやそれに付加された配列は問わない。

【 0 0 1 3 】

コード配列に隣接する配列として、対象とする宿主植物の細胞内で目的とするDNAの発現を制御する配列、例えば、プロモーターやエンハンサーを付加することができる。制御配列には、細胞の環境に関わらず構成的にDNAの発現を促すもののほか、環境に応じて誘導的にDNAの発現を促すものや、組織特異的にDNAの発現を促すものなどがある。構成的な制御配列の例としては、カリフラワー・モザイク・ウィルスの35Sプロモーターが挙げられる。誘導的な制御配列の例としては、リブローヌースリン酸カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子の光特異的発現制御配列が挙げられる。組織特異的な制御配列の例としては、ファゼオリン遺伝子の種子特異的発現制御配列が挙げられる。以上のような制御配列は、対象とする宿主植物の種類やトランスジェニック植物の利用形態に応じて適宜選択し利用できる。例えば、植物に導入したDNAを、その植物体の全体にわたって構成的に発現させるとその植物の生育が悪影響を受ける場合がある。このような問題は、誘導的もしくは組織特異的な制御配列の利用により回避できる。

【 0 0 1 4 】

この発明で用いるDNAは、そのコード配列に、それが本来コードするアミノ酸配列を変更することなく塩基に改変を加えることもできる。例えば、植物の遺伝子におけるGC含量やコドンの使用頻度は植物の種類により固有の特徴が認められる場合がある。対象とする宿主植物がこのような特徴を有する場合、その特徴に基づいてこの発明で用いるDNAにおけるコード配列を改変すれば、トラン

スジェニック植物における該DNAの発現を安定化することができる。また、コード配列内部に植物の遺伝子におけるイントロンを挿入すると、そのDNAの発現が増強されたり、安定化される場合もあるので、イントロンの挿入もこの発明においては有利に実施できる。

【0015】

さらに、この発明で用いるDNAは、そのコード配列の末端又は内部にシグナルペプチド又は細胞内小器官への局在化シグナルをコードする配列を付加することもできる。この発明で対象とする生理活性蛋白質の多くは分泌蛋白質であり、斯かる分泌蛋白質は、通常、本来的にN末端部にシグナルペプチドを有している。その本来のシグナルペプチドを利用することもできる一方、シグナルペプチドとして、他の起源のもの、例えば、酵母の α 因子における当該箇所を利用すると、トランスジェニック植物体内で生理活性蛋白質がより安定して細胞外に分泌される場合がある。したがって、目的に応じて適宜選ばれるシグナルペプチドに対するDNAをコード配列に付加すればよい。また、細胞内小器官への局在化シグナルを利用することにより、生理活性蛋白質の活性を損なうことなく、細胞内での安定な発現が達成される場合もある。この発明で用い得る局在化シグナルの例としては、小胞体滞留シグナル、葉緑体移行シグナル、ミトコンドリア移行シグナルなどが挙げられる。

【0016】

以上のようなDNAのクローン化ならびにクローン化されたDNAの改変に関する手法は、例えば、ジェイ・サンプルックら、『モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル』、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行（1989年）に種々詳述されている。この発明で用いるDNAは、これらの慣用の方法を必要に応じて適宜組み合わせて実施することにより得ることができる。

【0017】

この発明のトランスジェニック植物は、上記のようなこの発明で用いるDNAを植物に導入して形質転換することにより得られる。植物の形質転換は、大まかには、生物学的手法とDNAの直接導入法のいずれかによることができる。生物

学的手法の具体例としては、アグロバクテリウム属の微生物（以下、単に「アグロバクテリウム」という場合がある。）を介した方法が挙げられる。直接導入法としては、例えば、植物のプロトプラスト、細胞ないしは組織に外来DNAを直接導入する方法が挙げられる。これらの方法は、形質転換する宿主植物の種類に応じて適宜選択される。以下、それぞれの方法を適用するこの発明の実施の形態の概要を述べる。

【0018】

この発明で用いるDNA（以下、「外来DNA」という場合がある。）をアグロバクテリウムを介して植物に導入するには、先ず、外来DNAでT-DNA領域を置換したTiプラスミドを有するアグロバクテリウムを準備する。斯かるアグロバクテリウムを得るには、通常「中間ベクター法」と「バイナリーベクター法」と呼ばれる方法のいずれかによることができる。前者の方法においては、外来DNAを組み込んだベクター（中間ベクター）を常法により調製し、これを、病原性を消失させたT-DNAをTiプラスミド上にもつアグロバクテリウムに導入して相対的組換えにより該外来DNAをT-DNA領域に挿入する。後者の方法においては、アグロバクテリウムにおける複製起点とともに必要に応じて大腸菌における複製起点を有し、T-DNAの境界配列の間に介在させた外来DNAを含むベクター（バイナリーベクター）を常法により調製し、これを、T-DNAを欠失したTiプラスミドを有するアグロバクテリウムに導入する。中間ベクターならびにバイナリーベクターは植物における選択マーカを含むように設計するのが望ましい。選択マーカ具体例としては、カナマイシン耐性に関与するネオマイシン・フォスフォトランスフェラーゼ遺伝子やクロラムフェニコール耐性に関与するクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子などが挙げられる。以上の手法に有用なベクターとしては、Bin19（ATCC 37327）、pAK1003（ATCC 37425）、pAP2034（ATCC 37428）などが挙げられる。また、レイ・ウー及びローレンス・グロスマン編集、『メソッズ・イン・エンザイモロジー』、第153巻（アカデミック・プレス社発行、1987年）、第15章には、中間ベクター及びバイナリーベクターが種々紹介されており、これらの方法に準じて調製されるベクター

もこの発明において有利に利用することができる。

【0019】

斯くして得られる、外来DNAを含むアグロバクテリウムを植物に感染させれば該外来DNAを植物に導入することができる。アグロバクテリウムを植物に感染させるには、植物の種類に応じて選ばれる宿主、例えば、植物の組織、カルス、細胞又はプロトプラストを該アグロバクテリウムの存在下でインキュベートして感染させる。感染の後、引き続いて、斯かる宿主をオーキシンなどの適宜の植物分化誘導剤を含む培地中でインキュベートし、植物体に再生させる。斯くして得られる植物体の染色体DNAをPCRやサザン・ブロッティング等により解析し、外来DNAが組み込まれていることが確認され、所望の条件下で植物体内において該外来DNAの発現が確認されれば、この発明のトランスジェニック植物が得られたことになる。

【0020】

以上に示した、アグロバクテリウムを介する植物の形質転換方法は、アグロバクテリウムに対して感受性を示す植物、例えば、トマト、レタスをはじめとする多くの双子葉植物のほか、イネ、トウモロコシなどの一部の単子葉植物からのこの発明のトランスジェニック植物の創製に有用である。なお、以上の方法は、例えば、レイ・ウー及びローレンス・グロスマン編集、『メソッズ・イン・エンザイモロジー』、第153巻（アカデミック・プレス社発行、1987年）、第16章乃至第18章に種々詳述されており、これらの方法は、この発明を実施する上で適宜適用できる。

【0021】

外来DNAの直接導入による植物の形質転換は、例えば、パーティクルガンを用いる方法（バイオリスティック法）、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法などによることができる。バイオリスティック法による場合、外来DNAを、先ず、適宜のベクター、通常は、大腸菌で複製可能なものであって、選択マーカーを必要に応じてさらに含むプラスミドベクターに組み込み、組換えDNAとする。一方、DNAを導入する宿主として、対象とする植物の種類に応じて適宜選ばれる、その植物の組織、培養細胞、カルス、プロトプラストのいず

れかを常法により準備する。そして、上記の外来DNAを含む組換えDNAで重金属粒子を常法によりコートした後、該粒子を、ヘリウムガス等の適宜の噴射剤を用いる慣用のパーティクルガン（デュポン社製等）を用い、パーティクルガンの製造元の説明にしたがって、通常、1秒当たり数百メートルの速度で宿主を砲撃する。重金属粒子としては、通常、金やタングステンなどが利用できる。この操作の後、宿主を、その種類に応じて選ばれる適宜の方法により培養し、さらに、オーキシンなどの植物分化誘導剤の存在下で培養して植物体に再生させる。そして、アグロバクテリウムを介する方法による場合と同様に、再生した植物体が外来DNAを含み、該外来DNAの発現が確認されれば、この発明のトランスジェニック植物は得られたことになる。なお、バイオリスティック法は、適用できる植物種に特に制限がないという利点がある。

【 0 0 2 2 】

エレクトロポレーション法による場合、外来DNAを、先ず、バイオリスティック法の場合に準じて組換えDNAの形態に準備する。組換えDNAは、さらに、適宜の制限酵素処理などにより予め線状にしておくのが望ましい。宿主としては、対象とする植物のプロトプラストを常法により準備する。プロトプラストをマンニトール等の適宜の溶質で等張乃至高張にした塩溶液に懸濁し、45℃程度で加熱処理した後、外来DNAを含む組換えDNAをウシ胸腺DNAなどのキャリアDNAとともに混合し、慣用のエレクトロポレーター（ダイア・ログ社製等）を用いて電圧を付加する。適した電圧は宿主植物の種類により異なる場合があるので、一般的な条件を参考に予備実験により最適条件を決定しておくのが望ましい。電圧を付加した後、プロトプラストを軟寒天培地中で培養し、形成したコロニーをオーキシンなどの植物分化誘導剤の存在下で培養して植物体に再生させる。一方、ポリエチレングリコール法による場合、外来DNAと宿主植物は、エレクトロポレーション法と同様にして準備する。宿主としてのプロトプラストを適宜の培地に懸濁し、エレクトロポレーション法の場合と同様に加熱処理の後、外来DNA及びキャリアDNAと混合し、さらに適宜の液体培地に溶解させたポリエチレングリコールと混合する。混合物を30分間程度穏やかに振盪して外来DNAを導入する。その後、エレクトロポレーション法と同様にプロトプラスト

を培養し、植物体に再生させる。そして、アグロバクテリウムを介する方法による場合と同様に、再生した植物体が外来DNAを含み、該外来DNAを発現していることが確認されれば、この発明のトランスジェニック植物は得られたことになる。

【 0 0 2 3 】

エレクトロポレーション法ならびにポリエチレングリコール法は、プロトプラストの調製方法が確立されている植物、例えば、トウモロコシ、コムギ、イネなどのからのこの発明のトランスジェニック植物の創製に有用である。エレクトロポレーション法及びポリエチレングリコール法を含む植物へのDNAの直接導入法に関しては、例えば、レイ・ウー及びローレンス・グロスマン編集、『メソッズ・イン・エンザイモロジー』、第153巻（アカデミック・プレス社発行、1987年）、第19章乃至第21章に詳細に解説されており、これらの方法は、適宜この発明に適用できる。

【 0 0 2 4 】

以上のようにして得られるこの発明のトランスジェニック植物はその植物体内、望ましくは、通常食用に用いられる組織内に生理活性蛋白質を含有する。当該トランスジェニック植物の生理活性蛋白質含量は動物に摂取されたときにその体内で所期の活性が発揮できるレベルであればよい。植物の種類、形質転換の方法、生理活性蛋白質の種類や、該トランスジェニック植物を利用する動物の種類などにもよるけれども、該含量は植物体の生重量1kg当たり、通常、0.1ng以上、望ましくは、0.1μg以上である。該含量の上限は、当該トランスジェニック植物に所期の機能を発揮させる上では特に制限はないけれども、この発明で利用しうる植物の種類や形質転換の方法を考慮すると、通常、1mg以下である。

【 0 0 2 5 】

以上のとおり、この発明のトランスジェニック植物は、対象とする宿主植物に応じて選ばれる形質転換法を実施することにより適宜の植物種のもので得ることができる。この発明のトランスジェニック植物の種はヒトを含む動物が通常食用に用いるものであれば特に制限はないけれども、当該トランスジェニック植物を

経口的に摂取した際の機能発現をより安定して達成するためには、それを摂取する哺乳動物が加熱処理することなく食することのできるものが望ましい。ヒトを対象とする場合の望ましい植物種としては、例えば、キク科 (Asteraceae)、アブラナ科 (Brassicaceae)、ウリ科 (Cucurbitaceae)、セリ科 (Apiaceae)、バラ科 (Rosaceae)、ブドウ科 (Vitaceae)、ツツジ科 (Vaccinium)、パパイヤ科 (Caricaceae)、マメ科 (Fabaceae)、クルミ科 (Juglandaceae)、アカザ科 (Chenopodiaceae)、又はナス科 (Solanaceae) などに属する植物種、より詳細には、レタス、チコリ、ヨモギ、ブロッコリ、キャベツ、ダイコン、ワサビ、カラシ、キュウリ、メロン、カボチャ、ハヤトウリ、ニンジン、ミツバ、セロリ、リンゴ、プラム、ウメ、モモ、イチゴ、ラズベリー、アーモンド、ナシ、ピワ、ブドウ、クランベリー、コケモモ、ブルーベリー、パパイヤ、アルファルファ、ダイズ、クルミ、ハウレンソウ、トマト、トウガラシなどが挙げられる。ヒト以外の動物を対象とする場合の植物種としては、例えば、上記の科に属する植物種に加えて、例えば、ヒルガオ科 (Convolvulaceae)、イネ科 (Poaceae)、又はヤモノイモ科 (Dioscoreaceae)、又はヒルガオ科 (Convolvulaceae) などに属する植物種、より詳細には、サツマイモ、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ライムギ、ヤマノイモ、ジャガイモなどが挙げられる。

【0026】

この発明のトランスジェニック植物は、収穫されたそのままの形態か、または、通常食用として用いられる、葉、茎、根、果実、果皮、芽、種子及び花卉などの適宜の組織を単離し、必要に応じてさらに細断、皮剥、粉碎、圧搾、抽出するなどの適宜の加工を加えた形態、例えば、カット野菜、カット果実、粉末、ジュース、エキスなどとして提供される。当該トランスジェニック植物は、提供に先立ち、製品の鮮度を保持するために適宜の添加物により処理することも有利に実施できる。例えば、特開平9-224565号公報や特開平9-252719号公報に記載された、トレハロースを含む組成物を接触させることを特徴とするカット野菜の鮮度保持方法は、カット野菜又はカット果実としての当該トランスジェニック植物を提供する際に有用である。トレハロースは、食品級のものとしては、株式会社林原商事より商品名『トレハ』（登録商標）で販売されており、こ

の方法に有利に利用できる。なお、トレハロースは蛋白質一般の安定性を向上させる性質があることから、上記公報に記載の方法は、この発明のトランスジェニック植物が含有する生理活性蛋白質の活性をより安定に維持できるという利点もある。

【 0 0 2 7 】

以上説明したこの発明のトランスジェニック植物は、ヒトに限らず、家畜、家禽、愛玩動物等、動物全般の食用として有利に利用できる。利用方法に特に制限はないけれども、製品中に含まれる生理活性蛋白質の活性をより効果的に発揮させるためには、加熱処理することなく利用するのが望ましい。以上のようなこの発明のトランスジェニック植物をヒトを含む動物が経口的に摂取すると、医薬用途に利用される高度に精製された生理活性蛋白質が注射投与などの常法により利用される場合と比較すると、副作用を示し難く、穏やかに所期の効果を発揮する特長がある。また、斯くして利用されるこの発明のトランスジェニック植物は、医薬用途に利用される生理活性蛋白質がそれ自体で、又は、通常の医薬組成物としての形態で経口的に摂取される場合と比較すると、より確実に所期の効果を示す特長がある。したがって、この発明のトランスジェニック植物は、ヒトを含む哺乳類が日常的に利用できる、健康の維持・増進のための健康食品としてとりわけ有用である。

【 0 0 2 8 】

以下、実施例に基づきこの発明をより詳細に説明する。なお、斯界の技術水準によればこれらの実施例は適宜改変が可能である。したがって、この発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【 0 0 2 9 】

【実施例 1】

〈トランスジェニック・トマト〉

ヒト・インターフェロン α 遺伝子を導入したトマトを、以下のとおりアグロバクテリウムを介する形質転換法により作製した。

【 0 0 3 0 】

【実施例 1 - 1】

〈外来DNA導入用のアグロバクテリウムの調製〉

外来DNAの植物への導入に用いるアグロバクテリウムの受容株を、アール・デブレアら、『ニュークレイック・アシッド・リサーチ』、第13巻、4777頁（1985年）に記載の方法にしたがってアグロバクテリウム・ツメファシエンスを処理して調製した。調製した受容株は、ボーダー配列を含むT-DNA領域を完全に欠損したTiプラスミドを有するものである。

【0031】

外来DNAの転移のためのバイナリーベクターを、レイ・ウーら編集、『メソッズ・イン・エンザイモロジー』、第153巻（アカデミック・プレス社発行、1987年）、第16章に記載の、バイナリーベクターPGSJ280の調製方法にしたがって調製した。調製したベクターは、T-DNAのボーダー配列と、この間に、カリフラワー・モザイク・ウィルス35Sプロモーター、T-DNA由来のポリアデニレーション配列、及びカナマイシン耐性に関するネオマイシン・フォスフォトランスフェラーゼ遺伝子を含むものである。

【0032】

核酸データベース『ジェンバンク』より、アクセス番号Y11834を付して登録されているヒト・インターフェロン α 2遺伝子の塩基配列に関する情報入手した。この情報に基づいて設計し調製したプライマーと、鋳型としてのヒト染色体DNAとを用いて、通常のPCRにより、シグナルペプチドを含むヒト・インターフェロン α 2のコード配列からなるDNA断片を増幅した。増幅したDNA断片を上記で調製したバイナリーベクターのカリフラワー・モザイク・ウィルス35Sプロモーターの下流に挿入した。得られた組換えDNAを、常法にしたがい、上記で調製したアグロバクテリウムの受容株に導入した。斯くして、外来DNAとしてのヒト・インターフェロン α 2遺伝子の導入用のアグロバクテリウムを得た。

【0033】

【実施例1-2】

〈植物の形質転換〉

レイ・ウーら編集、『メソッズ・イン・エンザイモロジー』、第153巻（ア

カデミック・プレス社発行、1987年)、第16章に記載のタバコ葉の形質転換法に準じて、上記で得た外来DNA導入用のアグロバクテリウムでトマトを形質転換した。すなわち、約 0.5 cm^2 のディスクに切り取ったトマト葉を液体MS培地に浮かべ、実施例1-1で得た外来DNA導入用のアグロバクテリウムの培養液を該培地に1/100液量加え、植物培養器で25℃で2日間インキュベートしてアグロバクテリウムをトマト葉に感染させた。トマト葉を新鮮な液体MS培地で洗浄した後、常法にしたがい調製した抗生物質のセフトキシム及びカナマイシンと植物分化誘導剤のオーキシンを含むMS寒天培地に移し、植物培養器で、16時間の光照射と8時間の光非照射のサイクルを繰り返して25℃で3週間インキュベートし、トマト葉より根を誘導した。根が誘導されたトマト葉をオーキシンを含まないMS培地に移し、引き続き、同様に植物培養器中でインキュベートし、幼植物体に再生させた。再生した個々の幼植物体よりその一部分を採取し、常法により破碎し、破碎物を、ヒト・インターフェロン α 遺伝子の有無につき、通常のPCRにより試験した。該遺伝子の存在が確認された幼植物体を選択した。斯くしてトランスジェニック・トマトを得た。

【0034】

上記で再生させ、選択されたトランスジェニック・トマトの幼植物体を試験菜園に移して栽培した。形成したトマト果実を収穫し、これを、常法にしたがい調製した、等量の抽出用緩衝液(pH 8.0)中で破碎し、抽出した。抽出物を遠心分離し、上清を限外濾過して濃縮し、濃縮物を、通常のインターフェロン α の精製方法にしたがって部分精製した。この部分精製標品を、ヒトFL細胞とシンドビスウィルスとを用いる抗ウィルス活性の測定法に供した。抽出物の上清は、1mlあたり約35国際単位の抗ウィルス活性を含むものであった。

【0035】

1群10匹からなる2群のC3H/HeNマウス(6週齢、体重20g乃至30g)を用いて以下の動物実験を行った。第一の群のマウスには、上記と同様に栽培し収穫したトランスジェニック・トマトの果実を、細断し、1匹1日あたり湿重量で1gずつ与えた(試験群)。第二の群のマウスには、外来DNAを導入していないトマトを同様にして与えた(対照群)。試験開始の2週間後に全ての

マウスの体重を測定した後、血液を採取した。採取した血液を、それぞれ、 ^{51}Cr 標識した L_{929} 細胞を標的細胞として用いる通常のナチュラル・キラー活性の測定に供した。試験群のマウスの血液には、対照群と比べて明らかに高い活性が認められた。また、両群の間に体重の有意差は認められなかった。

【0036】

次に、ワクシニアウイルスを 200 pfu /匹の用量で感染させた C3H/HeN マウスを実験動物として用いたこと以外は上記と同様に操作した。試験開始の2週間後に全てのマウスの尻尾における痘疹を計測したところ、対照群のマウスと比較して試験群のマウスには明らかに少数の痘疹が認められたのみであった。

【0037】

以上の動物実験による結果は、本実施例によるトランスジェニック・トマトに含有されるヒト・インターフェロン α が、これを経口摂取したマウスの体内で副作用を示すことなくその免疫能を賦活したことを示している。以上のように、本実施例によるトランスジェニック・トマトをヒトを含む哺乳類が食用として用いるとその生体の免疫能が賦活されるので、該トマトは悪性腫瘍等の重篤な疾患を予防するための哺乳類の健康商品として有利に用いることができる。

【0038】

【実施例2】

〈トランスジェニック・ニンジン〉

ヒト・インターフェロン α 遺伝子を導入したニンジンをも、以下のとおりアグロバクテリウムを介する形質転換法により作製した。

【0039】

実施例1-1の方法に準じて、外来DNAとしてのヒト・インターフェロン α 2 遺伝子の導入用のアグロバクテリウムを調製した。常法により調製した、対数増殖期にあるニンジンのカルス培養物を滅菌シャーレに移し取った。このシャーレに、適量の、上記のアグロバクテリウムの培養物を添加し、 28°C で2日間インキュベートした。その後、ニンジン・カルスを新鮮な液体培地で洗浄し、常法にしたがって、抗生物質のカナマイシン及びセフトキシムと植物分化誘導剤の

オーキシンを含む培地中でさらに3週間インキュベートし、幼植物体に再生させた。再生した個々の幼植物体よりその一部分を採取し、常法により破碎し、破碎物を、ヒト・インターフェロン α 遺伝子の有無につき、通常のPCRにより試験した。該遺伝子の存在が確認された幼植物体を選択した。斯くしてトランスジェニック・ニンジンを得た。

【0040】

上記で再生させ、選択されたトランスジェニック・ニンジン幼植物体を試験菜園に移して栽培した。生長したニンジンの可食部（地下部）を収穫し、これを、常法にしたがい調製した、等量の抽出用緩衝液（pH 8.0）中で破碎し、抽出した。抽出物を遠心分離し、上清を限外濾過して濃縮し、濃縮物を、通常のインターフェロン α の精製方法にしたがって部分精製した。この部分精製標品を、ヒトFL細胞とシンドビスウィルスとを用いるインターフェロンの抗ウィルス活性の測定法に供した。抽出物の上清は、1mlあたり約27国際単位の抗ウィルス活性を含むものであった。

【0041】

1群10匹からなる2群のC57BL/6マウス（6週齢、体重20g乃至30g）を用いて以下の動物実験を行った。第一の群のマウスには、上記と同様に栽培し収穫したトランスジェニック・ニンジン、細断して1匹1日あたり湿重量で1gずつ与えた（試験群）。第二群のマウスには、外来DNAを導入していないニンジンと同様に与えた（対照群）。試験開始2週間後に全てのマウスの体重を測定した後血液を採取した。採取した血液を、それぞれ、YAC-1細胞を標的細胞として用いる通常のナチュラル・キラー活性の測定に供し、各群の平均値を求めた。試験群のマウスの血液には、対照群の約1.7倍の活性が認められた。また、両群の間で体重の有意差は認められなかった。以上のマウスによる試験は、本実施例によるトランスジェニック・ニンジンが含有するヒト・インターフェロン α が、マウスの体内で副作用を示すことなくその免疫能を賦活したことを示している。なお、本実施例によるトランスジェニック・ニンジンに代えて、ヒト・インターフェロン α の単離標品を含む通常のマウス用餌を、1日当たりのインターフェロン α の摂取量が本実験と同等になるように与えて本実験と同

様に操作したところ、本実験における試験群ほどの免疫能の賦活は観察されなかった。このことは、本発明によるトランスジェニック植物が、経口摂取した際により確実に所期の効果を発揮することを示している。

【0042】

以上のように、本実施例によるトランスジェニック・ニンジンを含む哺乳類が食用として用いるとその生体の免疫能が賦活されるので、該ニンジンは悪性腫瘍等の重篤な疾患を予防するための哺乳類の健康商品として有利に用いることができる。

【0043】

【実施例3】

〈トランスジェニック・レタス〉

ヒト・インターフェロン α 遺伝子を導入したレタスを、以下のとおりエレクトロポレーション法により作製した。

【0044】

【実施例3-1】

〈外来DNA導入用の組換えDNAの調製〉

実施例1-1に記載の方法にしたがって、ヒト・インターフェロン α 2遺伝子におけるコード配列からなるDNA断片をPCRにより増幅した。このDNA断片を常法にしたがって、プラスミドベクターpUC8に挿入した。常法にしたがって、得られた組換えプラスミドにおける挿入されたDNA断片の上流部にアラスカエンドウのリブローヌービスリン酸カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子の光特異的発現制御配列を配置するとともに、別の位置にクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を配置した。斯くして得られた組換えプラスミドを制限酵素処理して線状化した後、塩化セシウム密度勾配遠心により精製して、外来DNA導入用の組換えDNAとした。

【0045】

【実施例3-2】

〈植物の形質転換〉

レタスの葉を常法にしたがってセルラーゼ処理することによりレタスのプロト

プラストを調製した。レイ・ウーら編集、『メソッズ・イン・エンザイモロジー』、第153巻（アカデミック・プレス社発行、1987年）、第19章に記載されたタバコ・プロトプラストの形質転換法に準じて、レタス・プロトプラストに外来DNAを導入し、植物体に再生した。すなわち、先ず、レタス・プロトプラストをマンニトール（濃度0.4M）、塩化マグネシウム（濃度6mM）、2-モルホリノエタンスルホン酸（MES）（濃度1g/l）を含む緩衝液（pH 5.6）に懸濁し、細胞密度約 2×10^6 個/mlに調整した。この懸濁液を45℃で5分間インキュベートした後氷上で室温にまで冷却した。この懸濁液の0.25mlをポリカーボネート管に移し、これに、実施例3-1で調製した組換えDNAの4 μ gとキャリアDNAとしての仔ウシ胸腺DNAの20 μ gとを添加し、さらに、0.13mlのポリエチレングリコール溶液（濃度24%（w/v））を添加した。この混合物に、エレクトロポレーターを用いて、常法にしたがって、約1.5kV/cmの電圧を負荷し、外来DNAをプロトプラストに導入した。

【0046】

外来DNAを導入したプロトプラストを、アール・ディー・シリトラ、『プラント・セル・レポート』、第2巻、244頁（1983年）に記載された、アガロース・ビーズ・タイプ・カルチャー・システムにしたがって培養し、コロニーを形成させた。なお、培地には、クロラムフェニコールを常法にしたがって添加した。形成したコロニーを個々に採取し、常法にしたがって調製したオーキシンを含むLS培地に移し、コロニーより根を形成させた。引き続き、T培地に移し、幼植物体として再生させた。再生した個々の幼植物体よりその一部分を採取し、常法により破碎し、破碎物を、ヒト・インターフェロン α 遺伝子の有無につき、通常のPCRにより試験した。該遺伝子の存在が確認された幼植物体を選択した。斯くしてトランスジェニック・レタスを得た。

【0047】

上記で再生させ、選択されたトランスジェニック・レタスの幼植物体を試験菜園に移して栽培した。生長したレタスの可食部（地上部）を収穫し、これを、常法にしたがい調製した抽出用緩衝液（pH 8.0）の等量中で破碎し、抽出した

。抽出物を遠心分離し、上清を限外濾過して濃縮し、濃縮物を、通常のインターフェロン α の精製方法にしたがって部分精製した。この部分精製標品を、ヒトFL細胞とシンドビスウイルスとを用いる抗ウイルス活性の測定法に供した。抽出物の上清は、1 mlあたり約17国際単位の抗ウイルス活性を含むものであった。

【0048】

1群10匹からなる2群のNODマウス（6週齢、体重20乃至30g）を用いて以下の動物実験を行った。第一の群のマウスには、上記と同様に栽培し収穫したトランスジェニック・レタスの葉を、細断して1匹1回あたり湿重量として1gずつを週3回の頻度で与えた（試験群）。第二群のマウスには、外来DNAを導入していないレタスを同様に与えた。このスケジュールで38週間各群のマウスを飼育した。その後、個々のマウスより血液を採取して、各群ごとの血糖値の平均値と糖尿病の発症率を常法により調べた。試験群のマウスは、対照群と比べて血糖値が明らかに低く、また、糖尿病の発症率も顕著に低かった。以上のマウスによる試験は、本実施例によるトランスジェニック・レタスが含有するヒト・インターフェロン α が、マウスの体内でその免疫能を賦活し、その生体機能の調整に奏効したことを示している。

【0049】

以上のように、本実施例によるトランスジェニック・レタスをヒトを含む哺乳類が食用として用いるとその生体の免疫能が賦活されるので、該レタスは悪性腫瘍等の重篤な疾患を予防するための哺乳類の健康商品として有利に用いることができる。

【0050】

【実施例4】

〈トランスジェニック・イチゴ〉

ヒト・エリトロポエチンに対するcDNAを導入したイチゴを、以下のとおりアグロバクテリウムを介する形質転換法により作製した。

【0051】

【実施例4-1】

〈外来DNA導入用のアグロバクテリウムの調製〉

核酸データベース『ジェンバンク』より、アクセス番号X02157を付して登録されているヒト・エリトロポエチンに対するcDNAの塩基配列に関する情報を入手した。この情報に基づいてPCRプライマーを設計し調製した。これらのプライマーを用い、市販のヒト胎児肝臓ポリ(A)⁺RNAを鋳型としてを用いて通常のRT-PCRを実施し、成熟型のヒト・エリトロポエチンをコードするcDNAを増幅した。また、酵母α因子のシグナルペプチドをコードするDNAを通常のPCRにより増幅した。増幅したこれらのcDNA及びDNAを、該シグナルペプチドをコードするDNAの下流に該cDNAが配置するように、実施例1-1で用いたバイナリーベクターに挿入した。そして、得られた組換えDNAを実施例1-1にしたがってアグロバクテリウムの受容株に導入した。斯くして、外来DNAとしてのヒト・エリトロポエチンをコードするDNAの導入用のアグロバクテリウムを得た。

【0052】

【実施例4-2】

〈植物の形質転換〉

実施例1-2と同様に、レイ・ウーら編集、『メソッズ・イン・エンザイモロジー』、第153巻（アカデミック・プレス社発行、1987年）、第16章に記載のタバコの葉の形質転換法に準じて、上記で得た外来DNA導入用のアグロバクテリウムでイチゴを形質転換した後、幼植物体に再生させた。再生した個々の幼植物体よりその一部分を採取し、常法により破碎し、破碎物を、ヒト・エリトロポエチンをコードするDNAの有無につき、通常のPCRにより試験した。該DNAの存在が確認された幼植物体を選択した。斯くしてトランスジェニック・イチゴを得た。

【0053】

上記で再生させ、選択されたトランスジェニック・イチゴの幼植物体を試験菜園に移して栽培した。形成したイチゴ果実を収穫し、これと等量の、常法にしたがい調製した抽出用緩衝液（pH 8.0）中でこの果実を破碎し、抽出した。抽出物を遠心分離し、上清を限外濾過して濃縮し、濃縮物を、通常のエリトロポエ

チンの精製方法にしたがって部分精製した。この部分精製標品を、マウス胎仔肝細胞を用いて赤芽球前駆細胞の増殖を調べる通常のエリトロポエチン活性測定法に供した。抽出物は、1 m l あたり約 1 3 国際単位のエリトロポエチン活性を含むものであった。

【 0 0 5 4 】

1 群 1 0 匹からなる 3 群の B 6 C 3 F₁ マウス（6 週齢、体重 2 0 g 乃至 3 0 g）を用いて以下の動物実験を行った。第一の群のマウスには、貧血誘発剤であるフェニルヒドラジンを、1 日あたり、体重 1 k g あたり 1 0 m g の用量で投与し、上記と同様に栽培し収穫したトランスジェニック・イチゴの果実を、細断して湿重量で 1 日 1 匹あたり 2 g の用量で与えるとともに、通常の餌を与えた（試験群）。第二の群のマウスには、外来 D N A を導入していないイチゴを用いたこと以外は試験群と同様に餌とフェニルヒドラジンを与えた（対照群 1）。第三の群のマウスには、フェニルヒドラジンを投与せず、かつ、いずれのイチゴをも与えず、通常の餌のみを与えた（対照群 2）。試験開始日後第 1 4 日目に全てのマウスの体重を測定した後、各マウスの赤血球数を常法により測定して各群ごとに平均した。対照群 1 のマウスの赤血球数は対照群 2 の場合の約 6 0 % であり、対照群 1 のマウスに貧血が誘発されたことが確認できた。一方、対照群 1 と同様にフェニルヒドラジンを投与しつつ本実施例によるトランスジェニック・イチゴを与えた試験群のマウスにおいては、対照群 1 に比べて明らかに多数の、対照群 2 に匹敵する数の赤血球数が確認された。また、試験群と対照群 2 との間に体重の有意差は認められなかった。以上の結果は、本実施例によるトランスジェニック・イチゴが含有するヒト・エリトロポエチンが、マウスの体内でその本来の機能を穏やかに発揮し、赤血球数を正常値に戻すように生体機能を調整したことを示している。なお、本実施例によるトランスジェニック・イチゴに代えて、ヒト・エリトロポエチンの単離標品を含む通常のマウス用餌を、1 日当たりのエリトロポエチンの摂取量が本実験と同等になるように与えて本実験と同様に操作したところ、本実験の試験群に観察されたほどの効果は見られなかった。このことは、本発明によるトランスジェニック植物が、経口摂取した際により確実に所期の効果を発揮することを示している。

【0055】

以上のように、本実施例によるトランスジェニック・イチゴを哺乳類が食用として用いるとその生体機能が調整されるので、該イチゴは血球系の疾患を予防するための、また、諸疾患に伴う貧血等の体調不良を緩和するための健康商品として有利に用いることができる。

【0056】

【実施例5】

〈カット野菜ならびにカット果実〉

実施例1乃至4の方法により得たトランスジェニック植物からそれぞれの可食部を単離した。これらを水道水で洗浄し、常法により次亜塩素酸ナトリウムで殺菌した後、適宜の大きさに細断し、再度同様に、洗浄し殺菌してカット野菜ならびにカット果実とした。これらを、特開平9-224565号公報に記載の方法にしたがって、エチルアルコール（濃度1%（w/w））、トレハロース（濃度2%（w/w））及びビタミンC（濃度0.1%（w/w））を含む水溶液に5分間浸漬し、水切りした後、それぞれ別個に、直ちにポリエチレン袋に小分けして封入した。

【0057】

本品は、植物組織内に生理活性蛋白質を含み、該蛋白質の安定性が保持されているので、哺乳類の疾患を予防するための健康食品として有利に利用できる。また、本品においては、カットされた直後の野菜ないしは果実としての鮮度も安定に保持されているので、スーパーマーケット、コンビニエンスストア等における小売り商品としても有用である。

【0058】

【発明の効果】

以上説明したとおり、この発明は、哺乳類起源の生理活性蛋白質をコードするDNAで食用植物を形質転換して創製されたトランスジェニック植物を、ヒトを含む哺乳類が摂取すると、その哺乳類の生体機能が調整され、重篤な疾患の予防に奏効するという全く独自の知見に基づくものである。この発明のトランスジェニック植物が含有する生理活性蛋白質は、摂取された哺乳類の体内で、本来の機

能を穏やかに発揮する。したがって、当該トランスジェニック植物は、日常生活を送る上で、簡便に、重篤な疾患を予防するための健康食品としてとりわけ有用である。

【 0 0 5 9 】

この発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であるといえる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 悪性腫瘍等の重篤な疾患を日常生活を送る上で確度よく簡便に予防し得る手段を提供する。

【解決手段】 哺乳類起源の生理活性蛋白質をコードするDNAで食用の植物を形質転換して創製されたトランスジェニック植物を提供することにより解決する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-200195
受付番号	50000828911
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成12年11月 7日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 6月30日
【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000155908
【住所又は居所】	岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
【氏名又は名称】	株式会社林原生物化学研究所
【特許出願人】	
【識別番号】	500311668
【住所又は居所】	北海道札幌市西区西町南2丁目5番5号
【氏名又は名称】	杉本 千尋
【特許出願人】	
【識別番号】	592113500
【住所又は居所】	北海道夕張郡長沼町東5線北15番地
【氏名又は名称】	株式会社北海道グリーンバイオ研究所
【特許出願人】	
【識別番号】	390022954
【住所又は居所】	北海道札幌市中央区北4条西1丁目3番地
【氏名又は名称】	ホクレン農業協同組合連合会

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000155908]

1. 変更年月日 1998年10月21日

[変更理由] 住所変更

住 所 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
氏 名 株式会社林原生物化学研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [592113500]

1. 変更年月日 1992年 4月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道夕張郡長沼町東5線北15番地
氏 名 株式会社北海道グリーンバイオ研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390022954]

1. 変更年月日 1990年11月16日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道札幌市中央区北4条西1丁目3番地

氏 名 ホクレン農業協同組合連合会

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [500311668]

1. 変更年月日 2000年 6月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道札幌市西区西町南2丁目5番5号

氏 名 杉本 千尋